

**BAKTARIOZINE
BEI
ACINETOBACTER CALCOACETICUS**

OSKAR RATTENBERGER

1985

*Liss
München*



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Aus dem Max von Pettenkofer-Institut der Universität München
Vorstand: Prof. Dr. F. Deinhardt

BAKTERIOZINE
BEI
ACINETOBACTER CALCOACETICUS

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
an der Ludwig Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Oskar Rattenberger

aus
Neufahrn

1985

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. A. Bauernfeind

Mitberichterstatter: Prof. Dr. F. Deinhardt

Dekan: Prof. Dr. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: **7.11.1985**

DANKSAGUNG

Herrn Prof. Dr. A. Bauernfeind bin ich für die Überlassung des Themas, für die Führung während der Arbeit und die Diskussion der Ergebnisse dankbar.

Herrn Prof. Dr. F. Deinhardt danke ich für die Möglichkeit, an seinem Institut die Arbeit durchzuführen.

Den medizinisch-technischen Assistentinnen Frä. G. Hörl und insbesondere Fr. C. Petermüller danke ich für die geduldige technische Anleitung.

Meinem Cousin F. Rattenberger danke ich herzlich für die Übernahme der Schreibarbeiten.

W I D M U N G

meinen Eltern

Gliederung

1. Einleitung.....	1
1.1. Was sind Bakteriozine?.....	1
1.2. <i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	3
2. Material und Methoden.....	7
2.1. Material.....	7
2.1.1. Bakterienstämme.....	7
2.1.1.1. <i>Acinetobacter calcoaceticus</i> var. <i>anitratus</i>	7
2.1.1.2. <i>Acinetobacter calcoaceticus</i> var. <i>lwoffii</i>	8
2.1.1.3. Weitere Bakterienstämme zur Prüfung von Wirkspektren verschiedenartlicher Bakteriozine.....	9
2.1.1.4. Vergleichsstämme beim Bakteriozin-Diffusionsversuch und beim Versuch zum Ausschluß von Bakteriophagen.....	10
2.1.2. Geräte.....	10
2.1.3. Nährmedien, Reagentien.....	11
2.2. Methoden.....	12
2.2.1. Identifikation der <i>Acinetobacter</i> stämme.....	12
2.2.2. Mitomycinresistenz der <i>Acinetobacter</i> stämme.....	12
2.2.3. Ermittlung von Bakteriozinproducern und -indikatoren bei <i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	13
2.2.4. Verwandtschaftsbeziehungen der gefundenen Bakteriozine...17	
2.2.4.1. Hemmspektrum der <i>Acinetobacter</i> bakteriozine.....	17
2.2.4.2. Wirkung artfremder Bakteriozine auf <i>Acinetobacter</i> <i>calcoaceticus</i>	17
2.2.5. Ausschluß von Bakteriophagen.....	18
2.2.5.1. Diffusionsversuch.....	18
2.2.5.2. Verteilungsmethode.....	19
3. Ergebnisse.....	21
3.1. Mitomycin-MHK und Wahl der Mitomycinkonzentration zur Steigerung der Bakteriozinsynthese.....	21

3.2. Typisiererergebnisse bei <i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	23
3.2.1. Tabellarische Übersicht.....	23
3.2.2. Ist Bakteriozinsynthese bei <i>Acinetobacter calco-</i> <i>aceticus</i> durch Mitomycin C induzierbar?.....	27
3.2.3. Quantitative Betrachtung der Typisiererergebnisse.....	28
3.3. Ausschluß von Bakteriophagen.....	30
3.3.1. Diffusionsversuch.....	30
3.3.2. Verteilungsmethode.....	39
3.4. Verwandtschaftsbeziehungen der <i>Acinetobacter</i> bakteriozine - Charakterisierung der Hemmsubstanz -	45
4. Diskussion.....	46
4.1. Reproduzierbarkeit der Typisierung.....	46
4.1.1. Abhängigkeit von Material und Methoden.....	46
4.1.2. Reproduzierbarkeit der Ergebnisse.....	47
4.2. Anwendbarkeit der Erkenntnisse für epidemiologische Zwecke.....	48
5. Zusammenfassung.....	50
6. Literatur.....	51

1. Einleitung

1.1. Was sind Bakteriozine? (17,26)

Auf diese Frage soll nur soweit eingegangen werden, als es zum Verständnis dieser Arbeit notwendig erscheint.

Gratia beschrieb 1925 einen Antagonismus zwischen zwei *E. coli*-Stämmen und nannte den Wirkstoff des Stammes, der den anderen am Wachstum hinderte, „Colicin“.

Die Entdeckung ähnlicher Stoffe auch bei anderen Bakterienarten veranlaßte 1953 Jacob und Mitarbeiter zu der Bezeichnung „Bakteriozine“. Darunter verstanden sie Stoffe von Proteinnatur, die in der Lage sind, andere Stämme gleicher sowie nahe verwandter Spezies am Wachstum zu hemmen.

Es lassen sich zwei recht verschiedene Bakteriozintypen voneinander abgrenzen (8,9):

1. niedermolekulare Substanzen (Molekulargewicht zwischen 20.000 und 90.000), die thermostabil und trypsinempfindlich, in der Ultrazentrifuge nicht sedimentierbar und im Elektronenmikroskop nicht darstellbar sind.
2. hochmolekulare Substanzen (bacteriocin-like substances mit einem Molekulargewicht um 2.000.000), welche thermolabil, trypsinresistent, sedimentierbar sind und im Elektronenmikroskop als phagenschwanzähnliche Partikel imponieren.

Der Stamm, der ein Bakteriozin synthetisiert (= Producer), ist in der Regel immun gegen dieses, kann aber empfindlich gegenüber Produkten anderer Stämme sein.

Die Wirkung der Bakteriozine ist an das Vorhandensein von Rezeptoren beim Zielstamm (= Indikator) gebunden.

Von ihnen aus bewirken die angelagerten Bakteriozine einen „biochemischen Störprozeß“ (9,11,16), wobei eine Synthesestörung von Makromolekülen, Veränderung der Membranfunktion, DNA-Degradierung oder Beeinflussung des ATP-Gehalts der Zelle diskutiert werden.

Die Information zur Bakteriozinsynthese liegt häufig auf einem extrachromosomal liegenden DNS-Stück (Plasmid 8,9).

Nur in einem Bruchteil einer Zellkultur ($<1\%$) wird die vorhandene genetische Information zur Bakteriozinsynthese exprimiert und zwar in der logarithmischen Wachstumsphase.

Durch Röntgen- oder UV-Strahlung, Kanzerogene, Mutagene sowie Mitomycin C kann eine vermehrte Bildung induziert werden (9). Dabei erhöht sich allerdings nicht die Syntheseleistung einer Zelle, vielmehr steigt der Anteil der Producerstämme in einer Bakterienkultur.

Da durch oben genannte Substanzen auch temperente Phagen induziert werden können, ist bei einer Bakteriozintypie die Möglichkeit der Beteiligung von Bakteriophagen zu beachten.

1.2. *Acinetobacter calcoaceticus*

„Es gibt wohl wenige Erreger in der medizinischen Bakteriologie, über die soviel Verwirrung herrscht. Und kaum ein anderes Bakterium hat schon so oft seine Bezeichnung gewechselt wie *Acinetobacter calcoaceticus*“ (21).

Einige dieser alten Namen mögen hier erwähnt werden:

Mima polymorpha, *Bacterium anitratum*, *Herellea vaginicola*, *Moraxella lwoffii*, *Diplococcus mucosus*, *Neisseria winogradsky* (24).

Gerade letztere drei lassen erkennen, welche Schwierigkeiten es bereitete, *Acinetobacter calcoaceticus* von anderen Spezies zu unterscheiden (24).

Nach heutiger Auffassung war wohl Beijerinck der erste, der die heutigen *Acinetobacter* in Händen hatte und sie 1911 als „*Micrococcus calcoaceticus*“ beschrieb (4).

Diese Beispiele lassen erkennen, daß die Namensgebung meist auf der mikroskopischen Morphologie basierte - *Acinetobacter calcoaceticus* ist ein unbewegliches, gramnegatives, kokkoides Stäbchen, das häufig in Paaren vorliegt.

Man unterscheidet heute *Acinetobacter calcoaceticus* var. *anitratus* und *A. calcoaceticus* var. *lwoffii*, wobei das entscheidende Kriterium die Fähigkeit zur Kohlehydratspaltung (Glucose, Arabinose, Laktose, Xylose) ist.

Nur die erstgenannte Variante ist dazu in der Lage.

Nach den Erkenntnissen von Transformationsexperimenten sind beide Varianten jedoch genotypisch homogen und somit der gleichen Art zuzuordnen (5). *Acinetobacter*arten sind weiterhin Oxidase negativ, strikt aerob, wachsen auf MacConkey-Agar, können Citrat als Kohlenstoffquelle utilisieren, wachsen bei 20 und 42°C und sind unfähig zur Nitrat-Reduktion (21).

Eine andere Klassifizierung (25) des Genus *Acinetobacter* nennt vier „Biotypen“: *A. alcaligenes*, *A. anitratus*, *A. haemolyticus*, *A. lwoffii*. Ihr liegen Eigenschaften wie Hämolyse, Wachstum auf SS-Agar, Gelatinespaltung und Säurebildung aus Glucose zugrunde.

Acinetobacter calcoaceticus kommt weitverbreitet in der belebten und unbelebten Natur vor, so zum Beispiel in Oberflächenwasser und Erde. Aber auch bei Tieren, an Lebensmitteln sowie in der Luft wurde der Keim schon isoliert (21).

In Wohnhäusern und Hospitälern findet er sich sowohl in feuchten Bereichen (Waschbecken, Siphons) als auch in trockenem Milieu (Fußböden). Weiterhin ist *Acinetobacter calcoaceticus* Bestandteil der normalen menschlichen Flora.

So tragen bis zu 25% gesunder Individuen diese Spezies auf der Haut oder auch im Atemtrakt (23).

Vorhandensein in Wunden, Sputum und Urin darf daher nicht überraschen. Es führt in der Regel nicht zur manifesten Erkrankung. Harnwegsinfekte sowie Meningitiden kommen jedoch immer wieder vor (13,21). Es handelt sich also um einen ausgesprochenen Opportunisten (19,21,23), der bei prädisponierenden, abwehrmindernden Faktoren wie Alkoholismus, Diabetes, Immunsuppressionstherapie, größeren Verletzungen und Operationen sowie selektiver Antibiotikatherapie usw. allerdings auch zu ernststen Krankheitsbildern mit tödlicher Septikämie oder Pneumonie führen kann.

Eine wichtige Rolle spielen nosokomiale Infektionen mit *Acinetobacter*. Diese können aerogen erworben sein, besonders bei Luftbefeuchtung durch unsterile Kaltvernebler, bei Intubation (speziell endotracheal) sowie bei längerer Überdruckbeatmung (21).

Ein zweiter Infektionsweg führt über kontaminiertes oder kolonisiertes Personal, Infusionsbestecke, Katheter sowie andere operative Eingriffe. Die Letalität der durch *Acinetobacter calcoaceticus* bedingten nosokomialen Infektionen liegt mit 0,8% geringfügig unter dem auf alle nosokomialen Infektionen bezogenen Mittelwert von 0,9% (21).

Zur Antibiotikaresistenz bei *Acinetobacter calcoaceticus* lassen sich kaum allgemeingültige Aussagen treffen. Auch die Erkenntnis, Varianten vom lwoffii-Typ seien etwas empfindlicher als solche vom anitratus-Typ (6,24), kann heute nicht mehr ausnahmslos anerkannt werden.

So berichten Dibb et al. (10), daß sich zum Beispiel die Empfindlichkeit gegen Tobramycin umgekehrt verhält.

Gerade dieses Antibiotikum gilt zusammen mit N-Formimidoyl-Thienamycin, einem neuen beta-lactam Antibiotikum, als momentan wirksamste Einzelsubstanz im Kampf gegen resistente *Acinetobacter*spezies (6). Es werden resistente Stämme gegen nahezu alle Antibiotikagruppen gefunden, besonders Cephalosporine und Penicilline der älteren Generation erweisen sich als unwirksam (1).

Da es also kein sicher wirkendes Präparat gibt, ist heute bei einer nachgewiesenen behandlungsbedürftigen *Acinetobacter*-infektion in jedem Falle nach dem Ergebnis eines Antibiogramms zu therapieren.

Lange Zeit galten diese Erreger als gewöhnlich empfindlich gegen viele Substanzen (20), und man hatte zunächst keine Erklärung für auftauchende, oft multipel resistente Stämme. Hinchliffe und Vivian beschrieben schließlich 1979 ein auf ein bestimmtes Erregerspektrum (auch andere Bakterienspezies) übertragbares Plasmid, das Resistenzfaktoren gegen Sulfonamide trägt und zusätzlich in der Lage ist, nicht übertragbare Resistenzdeterminanten für Tetracycline und Neomycin zu mobilisieren (18).

Murray und Moellering (22) sowie Bergogne-Berezin (7) berichten über Aminoglycoside modifizierende Enzyme-Adenyltransferasen, Acetyltransferasen, Phosphotransferasen.

Als genetisches Äquivalent konnten mit Hilfe von Gel-Elektrophorese verschieden große Plasmide ermittelt werden.

Es sind aber auch Resistenzen bekannt, die anscheinend nicht durch Plasmide codiert werden (12).

Desinfektion ist unproblematisch, sofern die gültigen Regeln eingehalten werden. Es ist aber darauf hinzuweisen, daß *Acinetobacter calcoaceticus* gegenüber stark verdünnten Lösungen quartärer Ammoniumbasen resistent sein kann (21).

Bei dem in letzter Zeit zunehmenden herdförmigen Auftreten dieses Erregers bei hospitalisierten Patienten ist es notwendig, ein ausreichendes Typisierschema zur epidemiologischen Analyse zur Verfügung zu haben.

Es wurden Versuche unternommen mit Kapselquellungstesten, serologischen Markern, Fluoreszenzantikörpern und Antibio-grammen, die aber noch keine zufriedenstellenden Ergebnisse liefern konnten (12,14,19,24).

In dieser Arbeit soll nun überprüft werden, ob und inwieweit eine Typisierung mit Hilfe von Bakteriozinen ein geeigneter Weg ist für die hospitalhygienisch notwendige Aufklärung der Infektionswege endemisch auftretender *Acinetobacter calcoaceticus*-Infektionen.

2. Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1. Bakterienstämme

2.1.1.1. *Acinetobacter calcoaceticus* var. *anitratus*

- Abteilung experimentelle medizinische Mikrobiologie am
Max von Pettenkofer-Institut, München
20557, 20573, 26965, 1617
- Dr. E. Rosenthal, Essen (R)
R1, R5, R6, R7, R9, R11, R12
137, 1799, 1868, 3147, 11120
- Dr. H. Grimm, Weingarten (GR)
11647, 15792, 21648, 22909, 22201, 1476, 4158, 7609,
8819, 10796, 24731, 25305, 25387, 25411, 26157, 26617,
30208, 30437, 30893, 31517, 702, 4073, 3324, 2846, 4145,
2376
- Dr. H.J. Boltze, Erlangen (B)
8382, 8527, 8573, 8908, 8938, 9636, 9835, 9857, 9965, 130,
9964, 9145, 9177, 255B, 9505, 517, 255A, 9662A, 78, 10048,
10580, 8994, 10041, 9963, 9860, 10043, 10046, 9899, 10284,
10360, 10271, 10017
- Dr. G. Ruckdeschel, München-Großhadern (GH)
18349, 36051, 36618, 7372, 18483, 14159, 40655A, 40655B,
37042, 40824
- Dr. Freiesleben, Hamburg
J22, J183, J182, 3323/76, 3-160, J186, J184, 2-376,
4051, 2-225, J185, D4089, E3249 II, 2-1488, 2-1615,X,
2-1395, D1112, 2-i535
- Dr. Ullmann, Kiel
1787 I, 1787 II, 1625, 999, 1
- Dr. Sietzen, Ludwigsburg
A,B

- Dr. T. Fujitani, Osaka, Japan
IFO 12552, IFO 13006
- American Type Culture Collection (ATCC), Rockville, USA
ATCC 19606, ATCC 27224, ATCC 27225, ATCC 15151, ATCC 27230,
ATCC 27233, ATCC 27235, ATCC 27240, ATCC 27246

2.1.1.2. *Acinetobacter calcoaceticus* var. *lwoffii*

- Abteilung experimentelle medizinische Mikrobiologie am
Max von Pettenkofer-Institut, München
25384
- Dr. E. Rosenthal, Essen (R)
R2, R3, R4, R4a, R4b
- Dr. H.J. Boltze, Erlangen (B)
8404, 9006, 11461, 11053, 9596, 205
- Dr. G. Ruckdeschel, München-Großhadern (GH)
103, 109, 39269, 9678, 28787, 1629
- American Type Culture Collection (ATCC), Rockville, USA
ATCC 15309

2.1.1.3. Weitere Bakterienstämme zur Prüfung von Wirkspektren verschiedenartlicher Bakteriozine (Abteilung experimentelle medizinische Mikrobiologie des Max von Pettenkofer-Institutes, München):

- Producerstämme anderer Bakterienspezies

Pseudomonas aeruginosa: p4449

Klebsiella pneumoniae : K23

Enterobacter cloacae : SH 48

Providencia rettgeri : W39

- Indikatorstämme anderer Bakterienspezies

E. coli: Str. 115, TL 1

Klebsiella pneumoniae: ATCC 13883, 773

Klebsiella oxytoca: 764, 768, 785

Enterobacter cloacae: ATCC 13047, 17602, 17837

Enterobacter agglomerans: E25

Enterobacter aerogenes: 12370, 14480, 1669

Serratia marcescens: SH1, SH2

Citrobacter freundii: 22092, 22032

Achromobacter: 1216, 1300

Proteus vulgaris: W5

Providencia rettgeri: ATCC 9918, W4

Providencia stuartii: ATCC 25825, 406176, 407180

Morganella morganii: ATCC 9916, 19679

Salmonella typhimurium: ATCC 13311, 978

Salmonella Heidelberg: 9785

Salmonella agona: 978A

Shigella flexneri: 5

Pseudomonas aeruginosa: ATCC 10145

Pseudomonas fluoreszens: 1115, 1023

Pseudomonas putida: 917, 936

Staphylococcus aureus: ATCC 25923, ToBe, ATCC 29213

Staphylococcus epidermidis: MT5, MT9

Streptococcus faecalis: ATCC 29212, MBW, MBK

2.1.1.4. Vergleichsstämme beim Bakteriozin-Diffusionsversuch und beim Versuch zum Ausschluß von Bakterio- phagen

Klebsiella pneumoniae: K23, K468

Providencia rettgeri : J5, J38, J52, J87, D29

2.1.2. Geräte:

- Controlled Environment Incubator Shaker
New Brunswick Scientific Co. Inc. zur Bebrütung von
Bakterienflüssigkulturen bei 37°C geschüttelt
- Colony Counter
New Brunswick Scientific Co. Inc. zur Überprüfung der
Geschlossenheit des Bakterienrasens und zum Erkennen
von Plaques
- Corning Colorimeter 252 zur Messung der optischen Dichte
(OD) von Bakteriensuspensionen bei 600 nm
(OD 1000 = 1×10^9 Keime/ml)
- Gilford Spectrophotometer 240 zur Messung der Mitomycin C-
Konzentration bei 360 nm
- Denley Multipoint Inoculator zum Auftragen von Producern
und Indikatoren auf die Agarplatten
- Wasserbad

2.1.3. Nährmedien, Reagentien

- Tryptone Soya Broth (TSB), Difco Laboratories Detroit Michigan
Zusammensetzung (30 g/l aqua dest.):
Pancreatic Digest of Casein 17,0 g; Papaic Digest of Soybean Meal 3,0 g; Bacto-Dextrose 2,5 g; Sodium chloride 5,0 g; Dipotassium Phosphate 2,5 g
- Tryptic Soy Agar (TSA), Difco Lab. Detroit Michigan
Zusammensetzung (40 g/l aqua dest.):
Pancreatic Digest of Casein 15,0 g; Papaic Digest of Soybean Meal 5,0 g; Sodium chloride 5,0 g; Bacto-Agar 15,0 g
- Mueller-Hinton Broth (MHB), Difco. Lab. Detroit Michigan
Zusammensetzung (21 g/l aqua dest.):
Beef, Infusion from 300 g; Casamino Acid Technical 17,5 g; Bacto-Soluble Starch 1,5 g
- Mueller-Hinton Agar (MHB), Difco. Lab. Detroit Michigan
Zusammensetzung (38 g/l aqua dest.):
Beef, Infusion from 300 g; Bacto-Casamino Acids 17,5 g; Starch 1,5 g; Bacto-Agar 17,0 g
- Soft-Agar = Mueller-Hinton Broth + 0,7% Bacto-Agar
- Identifizierungssystem: API 20 E = Analytic Profile Index System S.A.,
Bio Mérieux, Nürtingen,
für Enterobacteriaceae
- Mitomycin C, Trockensubstanz 2 mg, „Kyowa“ for injection, Kyowa Hakko Kogyo Co. Tokyo gelöst in Methanol

2.2. Methoden

2.2.1. Identifikation der Acinetobacter-Stämme mit Hilfe von API 2o E bzw. API 2o NE, Bio Mérieux Nürtingen (Inokulation: 10^8 Koloniebildner pro ml)

2.2.2. Mitomycinresistenz der Acinetobacterstämme

Die Bestimmung der Mitomycinresistenz ist notwendig, um herauszufinden, welche Mitomycinkonzentrationen den Nährmedien zur Induktion der Bakteriozinsynthese zugesetzt werden können, ohne die Stämme am Wachstum zu hindern. Als Maß der Mitomycinresistenz diente die MHK (= minimale Hemmkonzentration). Dabei wird dem flüssigen Agar (Mueller-Hinton Medium) bei 55 - 60°C aus einer Stammlösung soviel Antibiotikum (hier Mitomycin C) zupipettiert, daß die gewünschte Endkonzentration in der Agarplatte (ca. 40 ml Agar in einer quadratischen (12 x 12cm) Petrischale) erreicht wird.

Zur Herstellung der Mitomycin C-Stammlösung wurde der Inhalt eines Fläschchens (ca. 2 mg) in 4 ml Methanol gelöst. Da der tatsächliche Inhalt stark schwankt, muß die genaue Aktivität der Substanz photometrisch bestimmt werden (bei $\lambda = 360$ nm).

Da bekannt ist, daß einer Extinktion von 742 eine Mitomycin-konzentration von 10 mg/ml entspricht, läßt sich die Konzentration der Stammlösung mit Hilfe der gemessenen Extinktion berechnen.

Auf diese vorgefertigten Agarplatten werden dann die zu testenden Stämme mit einem Multipoint-Inoculator aufgebracht. Zunächst werden dazu Bakterienkolonien in 4 ml MHB (Mueller-Hinton Broth) eingeimpft.

Die Bakteriensuspension wird auf OD 13 eingestellt. In diese

tauchen die Stifte des Multipoint-Inoculators und übertragen etwa 1,5 µl der Bakteriensuspension auf die Agarplatte. Diese werden 16 Stunden bei 37°C bebrütet.

Das Ablesen ist nur erlaubt, wenn die Wachstumskontrollen auf Platten ohne Antibiotikum positiv sind.

Als MHK wurde diejenige Mitomycinkonzentration genommen, bei der nur noch Einzelkolonien oder Schatten im Bereich der Impfpunkte zu erkennen waren.

2.2.3. Ermittlung von Bakteriozin-PRODUCERN und -INDIKATOREN bei *Acinetobacter calcoaceticus* (3)

Für die Typisierungsversuche wurden runde Petrischalen (Ø 8,5 cm) verwendet. Als Nährmedium wurde Tryptic Soy Agar (TSA) verwendet.

Da zu Beginn der Versuche nicht bekannt war, ob es bei *Acinetobacter calcoaceticus* überhaupt Bakteriozine gibt, mußten alle Stämme als potentielle Producer und Indikatoren angesehen werden.

1. Vorgehen mit einem Producer

Von frischen Kulturplatten (die Stämme wurden alle zwei Wochen überimpft) wurden Bakterien in 4 ml TSB (Tryptic Soy Broth) auf eine OD von etwa 50 eingimpft.

Die Suspension wurde im Schüttler bebrütet und auf OD 400 eingestellt. Diese Kulturen wurden nun mit TSB 1:5 verdünnt und danach mit Hilfe eines Multipoint-Inoculators auf die TSA-Platten übertragen, und zwar kreisförmig (Ø ~ 50 mm) in die Mitte der Platte.

Die beimpften Platten wurden 16 h bei 32°C bebrütet (stärkere Bakteriozinproduktion als bei 37°C).

Nach 16 h wurde der Produccerrasen mit einem Objektträger zu-

sammengeschoben und auf ein Filterpapier gebracht. Um auch die makroskopisch nicht mehr sichtbaren Producerüberreste zu beseitigen, wurden die Platten 15 min chloroformiert (2). Das Bakteriozin befindet sich nun im Agar im Bereich vorherigen Producerwachstums (oder auch etwas größerer Durchmesser bei guter Diffusion der gebildeten Bakteriozinmoleküle).

2. Vorgehen mit einem Indikator

Auch hier wurden Bakterien (1-3 Kolonien) in 4 ml TSB eingimpft, dann im Schüttler bebrütet und auf OD 65 eingestellt.

Diese Suspension wurde noch 1:500 verdünnt, bevor die Übertragung auf die Producerplatten mit dem Multipoint-Inoculator erfolgte. Der gleiche Indikatorstamm wird jeweils einmal innerhalb und einmal außerhalb der Zone mit Producerwachstum aufgimpft. Dazu wird je 1 ml der verdünnten Bakteriensuspension in zwei sterilisierte Metalltöpfchen gefüllt, in die dann die Impfstifte eintauchen und jeweils ca. 1,5 µl auf die Platte übertragen ($\approx$ einer Einsaat von ungefähr 200 Koloniebildnern/Punkt). Um die Verschleppung des evtl. im Agar befindlichen Bakteriozins zu vermeiden, müssen die Stifte nach jeder Platte abgeflammt werden.

Auf eine Platte können acht verschiedene Indikatorstämme aufgebracht werden (= 1 Indikatorsatz).

Die beimpften Platten werden 16 h bei 37°C bebrütet. Danach kann abgelesen werden. Hier sind folgende Ergebnisse möglich:

1. Indikatorstamm wächst innen stärker als außen = - (negativ) (dieses Ergebnis tritt allerdings nur bei besonders mitomycinempfindlichen Stämmen auf und ist wahrscheinlich dadurch zu erklären, daß durch die Producerzellen die Mitomycinkonzentration in der Innenzone vermindert worden war).
2. Indikatorstamm wächst innen gleich stark wie außen = - (negativ)

3. Indikatorstamm wächst innen etwas schwächer, ist im Vergleich zu außen im Wachstum nicht mehr als 50% gehemmt = -/+ (als negativ gewertet)
(dieses Ergebnis kann durch eine Erschöpfung des Mediums in der Producerzone erklärt werden)
4. Indikatorstamm ist im Wachstum innen stärker als 50% gehemmt = +/- (als positiv gewertet)
(hier erfolgt die Hemmung durch ein Bakteriozin, das vielleicht nicht ganz ausreicht, um eine totale Wachstumshemmung hervorzurufen)
5. Indikatorstamm ist innen überhaupt nicht gewachsen = + (positiv) (Bakteriozinwirkung)
6. Indikatorstamm wächst innen nicht, außen bleibt ein „Halbmond“ stehen = + (positiv)
7. Indikatorstamm wächst innen und außen nicht
(keine Aussage über Bakteriozinbildung möglich)

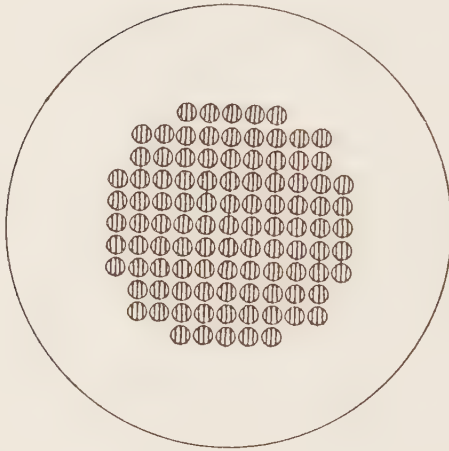
Um korrekte Ergebnisse zu erzielen, müssen die verwendeten Indikatorstämme zu Beginn und am Ende jedes Satzes auch auf Kontrollplatten gepointet werden (= Platten ohne Producerwachstum mit den verschiedenen im Versuch verwendeten Mitomycinkonzentrationen).

Nur wenn auf diesen Kontrollplatten alle 16 Bakterienpunkte erscheinen, ist eine Auswertung des Versuchs erlaubt.

Zur Verdeutlichung des beschriebenen Vorgehens mögen folgende Skizzen dienen:

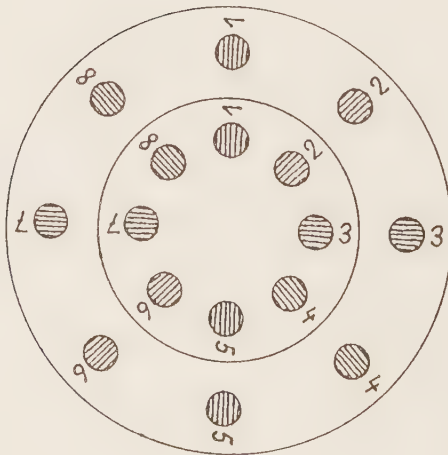
Darst.:

Producerinokulation

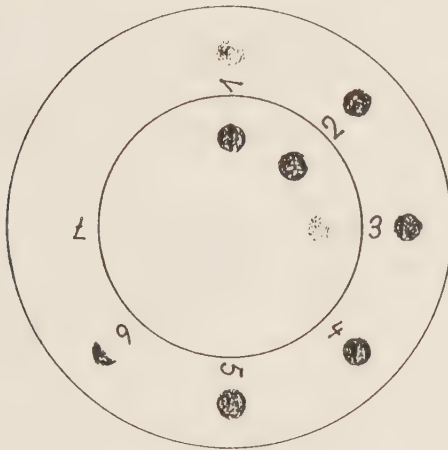


Darst.:

Indikatorinokulation



Darst.: Oben genannte mögliche Ergebnisse



2.2.4. Verwandtschaftsbeziehungen der gefundenen Bakteriozine

2.2.4.1. Hemmspektrum der Acinetobacter-Bakteriozine

Die Methodik entspricht der beim Typisieren von *Acinetobacter calcoaceticus*. Als Producer wurde jeweils ein *Acinetobacter*-producer verwendet, als Indikatoren verschiedene andere Spezies (siehe Material).

Den Platten wurde kein Mitomycin C zur Förderung der Bakteriozinsynthese zugesetzt, da die Wirkung von Mitomycin C auf die anderen Spezies nicht bekannt war.

2.2.4.2. Wirkung artfremder Bakteriozine auf *Acinetobacter calcoaceticus*

Methodik siehe oben. Als Producer wurden artfremde Stämme verwendet (siehe Material), als Indikatoren *Acinetobacter*-stämmen. Die Platten wiesen einen Mitomycingehalt von 0,25 µg/ml auf.

2.2.5. Ausschluß von Bakteriophagen

2.2.5.1. Diffusionsversuch

Dieser Versuch wurde auf Platten ohne Mitomycin C und auf Platten mit einer Mitomycinkonzentration von $0,25 \mu\text{g/ml}$ durchgeführt.

Mit den verwendeten Producern wurde dabei folgendermaßen vorgegangen:

Etwas Bakterienmaterial wurde in 4 ml TSB eingeeimpft und im Schüttler bebrütet. Es sollte eine Einsaat von ca. 35 Koloniebildnern pro Platte erreicht werden (diese Dichte wurde gewählt, um vereinzelte, deutlich getrennte Kolonien zu erhalten, damit evtl. erwartete Hemmhöfe erkennbar wären). Dazu wurde die bebrütete Suspension auf OD 35 eingestellt.

Es wurde nun nochmals mit steriler NaCl-Lösung um den Faktor 10^5 verdünnt (mehrere Schritte, gutes Mischen erforderlich), womit eine Bakteriendichte von 35 KB/100 μl erreicht war. Davon wurden 100 μl auf die Agarplatten übertragen und mit einer rechteckig gebogenen Öse über die ganze Fläche verteilt. Die Platten wurden 16 h bei 32°C bebrütet.

Die gewachsenen Producerkolonien wurden am Boden der Platte mit einem Filzstift durch Punkte markiert (so konnte man sich später auch Hemmhöfe ohne zentrale Producerkolonien erklären, welche beim Darübergießen des Softagars mit dem Indikator weggespült werden) und durch 15 minütiges Chloroformieren abgetötet (siehe 2.2.3.).

Die Indikatoren wurden auf folgende Weise vorbereitet:

Bakterien wurden in 4 ml TSB eingeeimpft, im Schüttler bei 37°C bebrütet und auf OD 50 eingestellt. Von dieser Suspension wurden 100 μl bei 50°C (im Wasserbad) in Röhrchen mit 3 ml Softagar gebracht, durchmischt und über die Producerplatten gegossen, was dann zu einem gleichmäßigen Indikatorrasen führte. Die Platten wurden wiederum 16 h bei 37°C bebrütet. Als Beurteilungskriterien galten die Größe des Hemmhofdurchmessers sowie die Art der Wachstumshemmung (gleichmäßig oder Plaques).

2.2.5.2. Verteilungsmethode

Auch hier wurden Medien ohne Mitomycin C und solche mit einer Mitomycinkonzentration von 0,25 µg/ml verwendet. Der Versuchsablauf bis zum Chloroformieren war der gleiche wie in 2.2.3. unter „Vorgehen mit einem Producer“ beschrieben. Lediglich kam noch dazu, daß im Anschluß daran 100 µl sterile NaCl auf die Platten pipettiert und mit einer rechteckig gebogenen Öse über die Zone vorherigen Producerwachstums hinaus verstrichen wurde. Die Öse wurde nach jeder Platte ausgeglüht. Damit bringt man evtl. in der Producerzone liegende Phagenpartikel in den producerfreien Randbereich.

Die Indikatoren wurden wieder in 4 ml TSB eingepflegt, im Schüttler bei 37°C bebrütet, hier aber auf OD 1000 eingestellt (was eine Optimierung des Ansatzes hinsichtlich Phagennachweis bedeutet, da vermehrungsfähige Phagen in der Lage sein würden, Plaques in den dichten Indikatorrasen zu „fressen“). 100 µl dieser Bakteriensuspension wurden mit 3 ml Softagar vermischt (50°C, Wasserbad) und gleichmäßig über die Platten gegossen.

Von großer Wichtigkeit im Bezug auf die Aussagekraft der Ergebnisse war es, die Indikatoren (ebenfalls 100 µl in 3 ml Softagar) auf die Platten ohne Producerwachstum (mit und ohne Mitomycin C) auszugießen.

Auch hier wurden die Indikatoren wieder 16 h bei 37°C bebrütet.

Danach folgte die Beurteilung der Ergebnisse anhand folgender Gesichtspunkte:

1. Art der Wachstumsheimmung in der Zone vorherigen Producerwachstums (gleichmäßig, diffus, nicht erkennbar → deutet auf Bakteriozinwirkung; löchriges Plaquennetz → Phagenwirkung)

2. Beschaffenheit der producerfreien Randzone
(geschlossenes Indikatorwachstum $\rightarrow$ Bakteriozin; scharf begrenzte, wie ausgestanzt wirkende Plaques $\rightarrow$ Phagenwirkung)
3. Geschlossenheit des Indikatorrasens auf den Platten ohne Producerwachstum (hier vorhandene Plaques würden auf temperente Phagen der Indikatoren, nicht von den Producern stammend, deuten, die durch mitomycineinfluß oder UV-Licht induziert wurden)

3. Ergebnisse

3.1. Mitomycin-MHK und Wahl der Mitomycinkonzentration zur
Steigerung der Bakteriozinsynthese

Tabelle 1: Mitomycin-MHK der Acinetobacterstämme

Stamm	Mitomycinkonzentration						$\left[\mu\text{g/ml} \right]$
	0,125	0,25	0,5	1	2	4	
R1						+	
R2					+	-	
R3					+	-	
R4				+	-		
R4a					+/-	-	
R4b				+	-		
R5						+	
R6						+	
R7						+	
R9						+	
R11						+	
R12				+	-/+	-	
1617						+	
20557						+	
20573						+	
25384					+	-	
26965						+	
8382						+	
IFO 12552						+	
8527						+	
8573						+	
8908						+	
8938						+	
IFO 13006						+	
9636						+	
9835						+	
9857						+	
11647						+	
15792						+	
21648						+	
22909						+	
22201						+	
1476						+	
4158						+	
7609						+	
8819						+	
10796						+	

Fortsetzung Tabelle 1:

Stamm	Mitomycinkonzentration						[$\mu\text{g}/\text{ml}$]
	0,125	0,25	0,5	1	2	4	
24731							+
25305							+
25387							+
25411							+
26157							+
26617							+
30208							+
30437							+
30893							+
31517							+
137							+
1799				+	-		
1868							+
3147							+
11120							+
103							+
18349							+
36051							+
36010							+
39269							+
7372	+	-					
109							+
9678							+
18483							+
28787							+

Hellinger (17) hatte zur Induktion der Bakteriozinsynthese bei *Providencia rettgeri* Mitomycin C-Konzentrationen von 0,01; 0,1; 0,25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ im Agar verwendet. Da im Bezug auf Mitomycin C bei *Acinetobacter calcoaceticus* keinerlei Anhaltspunkte vorhanden waren, sollte mit der MHK-Bestimmung getestet werden, ob diese Konzentrationen auch hier möglich waren.

Die Mitomycin C MHK-Bestimmung wurde nur für die in Tabelle 1 aufgeführten *Acinetobacter*-Stämme durchgeführt. Das erwies sich jedoch als ausreichend, da alle später erhaltenen und verwendeten Stämme bis auf eine Ausnahme (3323/76) bei den verwendeten Konzentrationen keine Wachstumshemmung erfuhren.

Wie aus Tabelle 1 ersichtlich, erfahren die meisten Stämme bei einer Mitomycin C-Konzentration von 4 $\mu\text{g/ml}$ noch keine Wachstumshemmung, die Stämme R4, R4b, R12 sowie 1799 haben eine MLK von 2 $\mu\text{g/ml}$. Einer Induktion mit 0,25 $\mu\text{g/ml}$ stand somit nur der Stamm 7372 im Wege mit einer MLK von 0,25 $\mu\text{g/ml}$. Dieser einzige Stamm (später ein weiterer, s.o.) blieb jedoch unberücksichtigt, um nicht mit der Konzentration zuungunsten der Bakteriozininduktion zu niedrig zu liegen.

Die Typisierung wurde also auf Platten ohne Mitomycin C ($\rightarrow$ spontane Bakteriozinproduktion) und auf solchen mit einer Konzentration von 0,25 $\mu\text{g/ml}$ durchgeführt (Bakteriozinsynthese nach Induktion).

Zum Stamm 7372 wäre noch anzumerken, daß er als Producer auf den Mitomycin-Platten nicht (oder manchmal sehr schwach) wuchs, als Indikator aber durchaus verwertbare Ergebnisse lieferte (Ergebnismöglichkeit 1 unter 2.2.3.).

3.2. Typisierungsergebnisse bei *Acinetobacter calcoaceticus*

3.2.1. Tabellarische Übersicht

Erläuterungen zur Tabelle 2:

Alle 70 als Indikatoren aufgeführten Stämme wurden auf potentielle Bakteriozinproduktion und -sensibilität untersucht (insgesamt 4900 Kombinationsmöglichkeiten). Nur die hier als Producer aufgelisteten Stämme konnten ein Bakteriozin produzieren, das einen der verwendeten Indikatoren am Wachstum hemmen konnte. Die „Nichtproducer“ werden hier aus Platzgründen nicht aufgeführt.

Im Rahmen eines Screenings (durchgeführt nur auf Platten mit 0,25 $\mu\text{g/ml}$ wegen hier durch Induktion erhöhter Wahrscheinlichkeit der Bakteriozinsynthese) wurden ferner weitere (unter Material, außer den o.e. 70 Stämmen) *Acinetobacter*stämme als potentielle Producer gegen solche Indikatoren getestet, die durch die in Tab. 2 aufgeführten Pro-

Tabelle 2: Hemmspektrum von Bakteriozinen bei Acinetobacter

Producer	Indikatoren														
	mito	R1	R2	R3	R4	R1a	R1b	R5	R6	R7	R9	R11	R12	2537	2573
R1	o												+	+	+
R5	o,25												+	+	+
	o												+	+	+
R6	o,25												+	+	+
	o												+	+	+
R7	o,25												+	+	+
	o												+	+	+
R11	o,25												+	+	+
	o												+	+	+
	o,25												+	+	+
R12	o														
	o,25														
25384	o														
	o,25														
26965	o												+		
	o,25												+		
1617	o													+	
	o,25													+	
3636	o												+/		
	o,25												+		
11647	o														
	o,25														
15792	o														+
	o,25														+
4158	o														
	o,25														
25305	o												+		+
	o,25												+		+
30208	o												+		+
	o,25												+		+
25387	o												+		+
	o,25												+		+
30893	o							+	+	+		+			
	o,25	+						+	+	+		+		+	+
36051	o							+	+	+		+			
	o,25														
36618	o												+		+
	o,25												+		+
40655 A	o													+	
	o,25													+	
40655 B	o														
	o,25														
37042	o														+/
	o,25														+
1799	o														
	o,25														
1868	o														+/
	o,25														+/
ATCC 27225	o												+		+
	o,25												+		+
1505	o														
	o,25														
2846	o	+						+	+	+		+	+/	+	+/
	o,25	+						+	+	+		+	+/	+	+/

+ = Wachstum gehemmt
 = keine Wachstumsheimmung
 +/ = Hemmung < 50%

x = Wachstum gehemmt bei
 Mitomycin C 0,5 µg/ml
 +/ = Hemmung > 50% siehe 2.2.3.

Fortsetzung Tabelle 2:

producer	Mito	9036	9035	9037	11647	15792	21646	22909	22201	1476	4158	7609	8819	10796	24731	25305	25367	25411	26157	26617	30208	30437	30693	30703
	0			+		+														+			+	
	0,25			+		+														+			+	
	0			+		+														+			+	
	0,25			+		+														+			+	
	0			+		+														+			+	
	0,25			+		+														+			+	
	0			+		+														+			+	
	0,25			+		+														+			+	
	0			+		+														+			+	
	0,25			+		+														+			+	
	0			+		+														+			+	
	0,25			+		+														+			+	
	0			+		+														+			+	
	0,25			+		+														+			+	
	0			+		+														+			+	
	0,25			+		+														+			+	
	0			+		+														+			+	
	0,25			+		+														+			+	
	0			+		+														+			+	
	0,25			+		+														+			+	
	0			+		+														+			+	
	0,25			+		+														+			+	
	0			+		+														+			+	
	0,25			+		+														+			+	
	0			+		+														+			+	
	0,25			+		+														+			+	
	0			+		+														+			+	
	0,25			+		+														+			+	
	0			+		+														+			+	
	0,25			+		+														+			+	
	0			+		+														+			+	
	0,25			+		+														+			+	
	0			+		+														+			+	
	0,25			+		+														+			+	
	0			+		+														+			+	
	0,25			+		+														+			+	
	0			+		+														+			+	
	0,25			+		+														+			+	
	0			+		+														+			+	
	0,25			+		+														+			+	
	0			+		+														+			+	
	0,25			+		+														+			+	
	0			+		+														+			+	
	0,25			+		+														+			+	
	0			+		+														+			+	
	0,25			+		+														+			+	
	0			+		+														+			+	
	0,25			+		+														+			+	
	0			+		+														+			+	
	0,25			+		+														+			+	
	0			+		+														+			+	
	0,25			+		+														+			+	
	0			+		+														+			+	
	0,25			+		+														+			+	
	0			+		+														+			+	
	0,25			+		+														+			+	
	0			+		+														+			+	
	0,25			+		+														+			+	
	0			+		+														+			+	
	0,25			+		+														+			+	
	0			+		+														+			+	
	0,25			+		+														+			+	
	0			+		+														+			+	
	0,25			+		+														+			+	
	0			+		+														+			+	
	0,25			+		+														+			+	
	0			+		+														+			+	
	0,25			+		+														+			+	
	0			+		+														+			+	
	0,25			+		+														+			+	
	0			+		+														+			+	
	0,25			+		+														+			+	
	0			+		+														+			+	
	0,25			+		+														+			+	
	0			+		+														+			+	
	0,25			+		+														+			+	
	0			+		+														+			+	
	0,25			+		+														+			+	
	0			+		+														+			+	
	0,25			+		+														+			+	
	0			+		+														+			+	
	0,25			+		+														+			+	
	0			+		+														+			+	
	0,25			+		+														+			+	
	0			+		+														+			+	
	0,25			+		+														+			+	
	0			+		+														+			+	
	0,25			+		+														+			+	
	0			+		+														+			+	
	0,25			+		+														+			+	
	0			+		+														+			+	
	0,25			+		+														+			+	
	0			+		+														+			+	
	0,25			+		+														+			+	
	0			+		+														+			+	
	0,25			+		+														+			+	
	0			+		+														+			+	
	0,25			+		+														+			+	
	0			+		+														+			+	
	0,25			+		+														+			+	
	0			+		+														+			+	
	0,25			+		+														+			+	
	0			+		+														+			+	
	0,25			+		+														+			+	
	0			+		+														+			+	
	0,25			+		+														+			+	
	0			+		+														+			+	
	0,25			+		+																		

[illegible]

+ = Wachstum gehemmt
= keine Wachstumsheimmung
-/+ = Heimmung < 50%

x = Wachstum gehemmt bei
Mitomycin C 0,5 µg/ml
+/- = Hemmung > 50% siehe 2.2.3.

ducer nicht am Wachstum zu hemmen waren (Die Producer ATCC 27225, 9505, 2846 wurden im Rahmen dieses Screenings entdeckt, erwiesen sich als wertvoll für die Typisierung und wurden deshalb gegen alle 70 Indikatoren getestet, auch ohne Mitomycin). Einige dieser zusätzlichen Producer werden wegen ihrer relativen Bedeutungslosigkeit für die Typisierung nicht näher beschrieben.

3.2.2. Ist Bakteriozinsynthese bei *Acinetobacter calcoaceticus* durch Mitomycin C induzierbar?

Diese Frage läßt sich nach den gewonnenen Ergebnissen positiv beantworten.

Aus Tabelle 2 können genügend derartige Fälle entnommen werden, hier sollten lediglich einige Ergebnisse behandelt werden. So kann der Stamm 25384 die Indikatoren 103 und 109 (erwiesen sich später als identisch) bei 0,25 µg/ml vollständig am Wachstum hemmen, ohne Induktion nicht. Das gleiche ist zu beobachten beim Producer 30893 und den zugehörigen Indikatoren 4158 sowie 25411. Besonders beeindruckend ist jedoch die Induktion der Bakteriozinsynthese beim Stamm 2846. Dieser breiteste Producer vermag 13 von insgesamt 25 Indikatoren erst bei einer Mitomycinkonzentration von 0,25 µg/ml zu hemmen. Die meisten dieser Fälle waren obendrein ohne Stimulation ganz klar negative oder -/+ Ergebnisse, mit Stimulation dagegen eindeutig + Resultate. Recht deutlich sollte sich dieser „Mitomycineffekt“ später noch einmal bei den Versuchen zum Phagenausschluß zeigen.

Vor Auffinden des Producers 2846 wurde die Möglichkeit der Induktion bereits in einem eigenen Versuch überprüft. Alle bekannten Producer (siehe Tab. 2, dazu 10284 und 10360, nicht aber der Stamm 2846!) wurden stimuliert durch eine Mitomycinkonzentration von 0,5 µg/ml Agar.

Als Indikatoren wurden alle zu diesem Zeitpunkt noch nicht

hemmbaren Acinetobacterstämme benutzt, nämlich

R2, R3, R4, R4a, R4b, R9, 2o573, 8382, 8527, 8573, 89o8, 8938, 9835, 11647, 21648, 222o1, 229o9, 1476, 76o9, 1o796, 24731, 25387, 26157, 3o437, 137, 18349, 36o51, 36618, 39263, 28787, 37o42.

Auch hier konnte die Bakteriozinsynthese einiger Stämme induziert werden, die positiven Ergebnisse sind in Tabelle 2 mit x gekennzeichnet. In diesen Fällen konnte jeweils ohne Mitomycin C und bei 0,25 µg/ml noch keine Wachstumshemmung erzielt werden (Ausnahme: Producer 3o893 / Indikator 11647: bei 0,25 µg/ml bereits +/-).

Ein Großteil der gefundenen Producer ist demnach in der Lage, spontan Bakteriozine zu produzieren, andererseits ist aber Induktion der Synthese durch Mitomycin C möglich.

3.2.3. Quantitative Betrachtung der Typisiererergebnisse

Für diese Überlegungen werden zunächst die anfangs vorhandenen 7o Stämme (Indikatoren in Tabelle 2) herangezogen. Identische Stämme könnten zu einer nicht unerheblichen Verzerrung der Ergebnisse führen. Die 7o sollte deshalb durch Ausschluß von Kopien berichtigt werden. In Producer- und Indikatoreigenschaften sowie im Antibiotogramm aus 37 Antibiotika übereinstimmende Stämme wurden als identisch gewertet.

Gleiche Herkunft und Kolonie-Morphologie erwiesen sich als epidemiologisch wenig nützliche Marker.

Mit an Sicherheit grenzender Wahrscheinlichkeit identisch sind die Stämme R1, R5, R6, R7, R11; die Stämme 8382, 8527, 8573, 89o8, 8938; die Stämme 1o3 und 1o9 sowie die Stämme 253o5 und 3o2o8 und schließlich R2 und R3.

Nimmt man nun nur jeweils einen aus den Gruppen identischer

Stämme, so verringert sich die Stammzahl auf 59 (weitere Kopien können besonders unter den nicht bakteriozintypisierbaren Stämmen vorhanden sein. Dadurch würden die im folgenden genannten Zahlen nur erhöht, es wird also eher ein zu schlechtes Ergebnis vorgetäuscht!).

Von diesen 59 Stämmen haben 19 Productereigenschaften gegen die verwendeten Indikatoren, das entspricht einem Prozentsatz von 32% (bei einer Mitomycinkonzentration von 0,25 µg/ml). Indikatoreigenschaften besitzen bei 0,25 µg/ml Mitomycin-gehalt des Agars 28 der 59 Stämme, das entspricht 47%; bei 0,5 µg/ml Mitomycin 54%. Betrachtet man dieses System von 59 Stämmen, so würden sich bei einem Typisierungsversuch nach Producer- und Indikatoreigenschaften 36 Stämme (= 28 + 8; 11 der 19 Producer haben auch Indikatorfunktion, weshalb die Zahlen nicht einfach addiert werden dürfen) typisieren lassen, das sind 61%.

Mit der Hinzunahme der Producer 9505 und besonders 2846 können diese Zahlen angehoben werden. Mindestens 40 dieser Stammgruppe von jetzt 61 Stämmen haben Indikatoreigenschaften, das sind 65%.

Kombiniert man nun Producer- und Indikatorsystem, erhält man eine Typisierbarkeit von $40 + 4 = 44$ Stämmen, was einer Prozentzahl von 72% entspricht (dabei haben 15 der Producer zugleich Indikatorfunktion).

Um die Typisierbarkeit zu erhöhen, wurde auch die Bakteriozinzirkung artfremder Producerstämmen (*Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter cloacae*, *Providencia rettgeri*) auf die 70 *Acinetobacter*stämmen untersucht. Dabei konnten lediglich *Providencia rettgeri* und *Pseudomonas aeruginosa* jeweils die Stämme R2 und R3 (identisch) vollständig hemmen. Producer- und Indikatorbreite können aus Tabelle 2 entnommen werden. Der breiteste Producer 2846 ist in der Lage, verschiedene Bakteriozine zu synthetisieren.

3.3. Ausschluß von Bakteriophagen

3.3.1. Diffusionsversuch

Diese Versuchsanlage erlaubt es, anhand der Beschaffenheit der Hemmhöfe Rückschlüsse auf die Art der wachstumshemmenden Substanz zu ziehen. So ist es für die in der Regel kleineren Bakteriozinmoleküle (Molekulargewicht 20.000 bis 90.000) möglich, relativ weit im Agar zu diffundieren, was einen großen Hemmhof zur Folge hat. Die wesentlich größeren Phagenschwanzbakteriozine (mit einem M_G bis zu 2.000.000) dagegen würden wegen ihrer sehr geringen Diffusion im Agar kleine Hemmhöfe hervorrufen. Komplette Phagen hingegen würden **aufgrund** ihrer Größe überhaupt nicht diffundieren.

Ein weiteres Kriterium, das für Bakteriozine spricht, ist das Vorhandensein der zentralen Producerkolonie im Hemmhof. Vermehrungsfähige Phagen würden durch das Übergießen mit dem Indikator verteilt werden, was zu Plaques außerhalb der markierten Producerkolonien führen müßte. Dieses Verteilen ist bei im Agar enthaltenem, nicht vermehrungsfähigem Bakteriozin zwar in geringer Menge möglich, einzelne Moleküle genügen aber nicht zur Aufhellung des Indikatorrasens. Allerdings ist ein Hemmhof ohne deutlich sichtbaren zentralen Producer auch bei Bakteriozinwirkung manchmal zu sehen, der durch Wegschwemmen noch nicht abgetöteten Producermaterials (bei starkem Wachstum reichte offenbar das Chloroformieren nicht ganz aus) und dessen Weiterwachsen (Bakteriozinproduktion!) zu erklären ist.

Diese kleineren Hemmhöfe weisen jedoch eine kleine zentrale Producerkolonie sowie unscharfe Ränder auf (Diffusion), wodurch sie sich recht deutlich von den Phagenplaques unterscheiden lassen.

Um bei der Beurteilung der Hemmhöfe Vergleichsmöglichkeiten zu haben, wurden bei diesem Experiment bekannte Producer-Indikatorpaare mit einem wenig (Providencia rettgeri Pr J5,

In J52 und J38) und einem gut diffusiblen Bakteriozin (Klebsiella pneumoniae Pr K23, In K468) zugezogen. Weiterhin wurden alle in Tabelle 2 aufgeführten Producer sowie jeweils mindestens ein dazugehöriger Indikator verwendet. Nachfolgend seien nun die erzielten Ergebnisse zunächst dargestellt und anschließend die verschiedenen Ausprägungen dieser durch ausgewählte Beispiele illustriert.

Tabelle 3: Charakterisierung der Wachstumsheimmwirkung von
Producerkolonien

Producer	Indikator	mittlerer Heimhofdurchmesser (mm)	Beurteilung des Heimmhofes
R5	o o,25	20557 5-6 5-6	klarer Heimmhof "
R12	o o,25	IFO 12552 keine Producerkol. 1,5	schwach erkennbar. Heimmhof
25384	o o,25	109 3 3	schwach erkennbar. Heimmhof fast klarer HH (Mitoeffekt!)
26965	o o,25	26617 4-5 4-5	nicht ganz klarer HH "
1617	o o,25	26617 3 3	fast klarer HH "
	o o,25	IFO 13006 3 3	gut erk.bar. HH,ab.nicht klar "
4636	o o,25	20557 3-4 3-4	schwach erkennbarer HH "
11647	o o,25	IFO 12552 1 1	fast klarer HH "
15792	o o,25	25384 1,5 1,5	schwach erkennbarer HH "
4158	o o,25	14159	Heimhöfe nicht erkennbar "
25305	o o,25	14159 3-4 4-5	gut erk.bar. HH,ab.nicht klar "
25387	o o,25	14159 3-4 3-4	gut erkennbarer HH,deutlicher " (Mitoeffekt!)
30208	o o,25	20557 3-4 3-4	gut erk.bar. HH,ab.nicht klar "
	o o,25	26617 3-4 3-4	gut erkennbarer HH "
1799	o o,25	3147	Heimhöfe nicht erkennbar "

Fortsetzung Tabelle 3:

Producer	Indikator	mittlerer Hemmhofdurchmesser (mm)	Beurteilung des Hemmhofes
30893 o	R5	6-7	klare HH
o,25		6-7	"
o	25411	1,5	klare HH, dazu 3 mm Ø
o,25		1,5	" Aufhellung, Mitoeffekt!
36051 o	9006	3-4	klare HH
o,25		3-4	"
o	109	2-3	klare HH
o,25		2-3	"
36618 o	26617	2,5-4	klare HH
o,25		2,5-4	"
o	20557	3	gut erkennb. HH, nicht klar
o,25		3	"
40655 o	9006	3	klare HH
A o,25		3	"
40655 o	9006	2-3	klare HH
B o,25		2-3	"
37042 o	9006	3-4	klare HH
o,25		3-4	"
1868 o	9006	2,5-4	klare HH
o,25		2,5-4	"
ATCC o	20557	4	gut erkennb. HH, nicht klar
27225 o,25		4	"
o	15792	4	"
o,25		4	"
9505 o	9006	3-4	klare HH
o,25		3-4	"
o	106	2-3	klare HH
o,25		2-3	"
2846 o	R5		HH nur da erkennbar, wo
o,25		1	Producterkolonie wegge-
o	8382		schwimmt wurde, Mitoeffekt!
o,25		1	vgl. J5/J52
o	1617		"
o,25		1	"

Fortsetzung Tabelle 3:

Vergleichskontrollen

Producer	Indikator	mittlerer Hemmhofdurchmesser (mm)	Beurteilung des Hemmhofes
nicht diffusibel			
J5	o J52 0,25		keine HH erkennbar (erwartet, da Bakteriozin unter Producer)
	o J38 0,25	1 1	gut erkennbar. HH, optimaler klarerer HH Mitoeffekt
diffusibel			
K23	o K468 0,25	9-10 12-13	klarerer Hemmhof, optimaler " Mitoeffekt

Wie aus Tabelle 3 zu entnehmen und auf dem ausgewählten Bildmaterial zu erkennen ist, ergibt sich kein Hinweis auf Phagenwirkung. Aus den verschiedenen Hemmhofgrößen ist möglicherweise zu schließen, daß es bei *Acinetobacter calcoaceticus* Bakteriozine verschiedenen Molekulargewichts gibt (evtl. auch Phagenschwanzbakteriozine z.B. bei 4158, 1799, 2846).

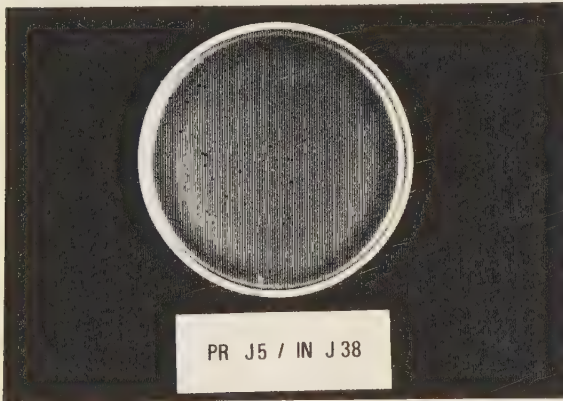
Allerdings haben auch die Bakteriozinkonzentrationen Einfluß auf Hemmhofgröße und -aufhellungsgrad.

Da hier und auch im anschließenden Verteilungsversuch nicht alle Indikatoren verwendet wurden, ist eine Phagenwirkung bei einigen Indikatoren zwar möglich, aber aufgrund der hier erzielten Ergebnisse doch unwahrscheinlich.

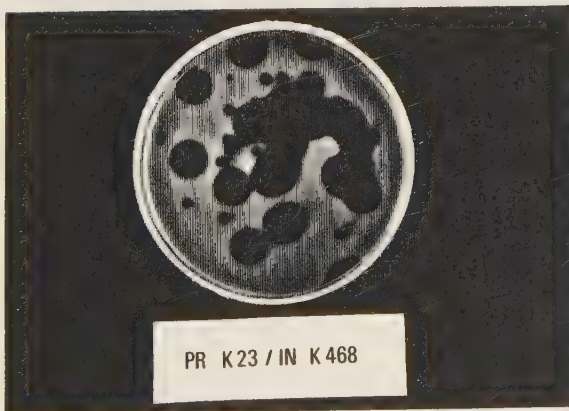
In einer späteren Arbeit konnten Phagen als Ursachen der Wachstumshemmung ganz ausgeschlossen werden (15).

Ausgewählte Beispiele zum Diffusionsversuch:

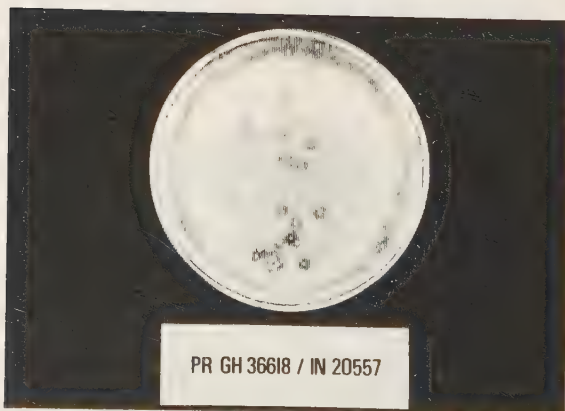
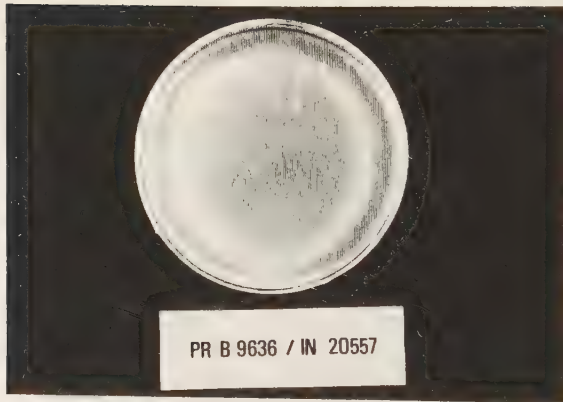
Beispiel für kaum
diffusibles Bakteriozin
(*Providencia rettgeri*)



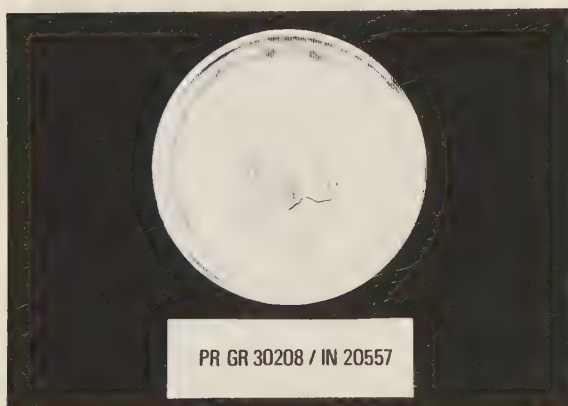
Beispiel für gut
diffusibles Bakteriozin
(*Klebsiella pneumoniae*)



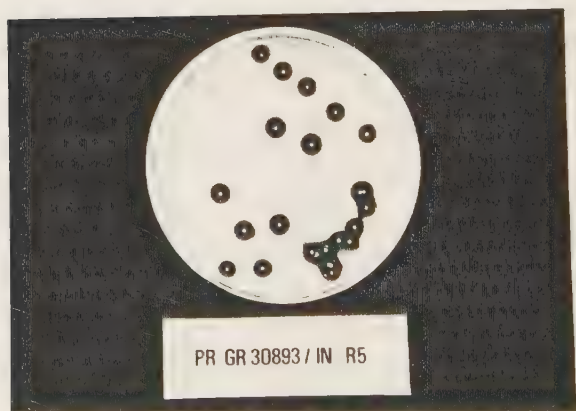
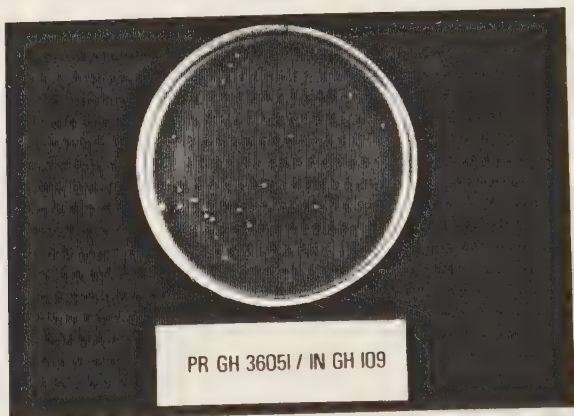
Acinetobacter-Bakteriozine



Acinetobacter-Bakteriozine



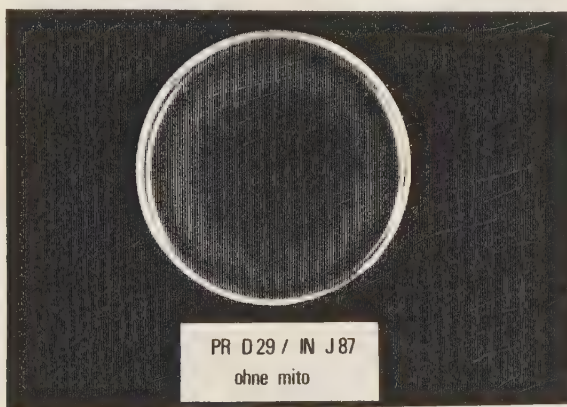
Acinetobacter-Bakteriozine



3.3.2. Verteilungsmethode

Hier wurden dieselben *Acinetobacter*-Producer und -Indikatorstämme verwendet wie im Diffusionsversuch (vgl. oben). Zusätzlich wurden zwei *Providencia rettgeri*-Stämme eingesetzt:

Der Producer D29, von dem bekannt war, daß er einen Phagen hat, der den als Indikator verwendeten Stamm J87 zu lysieren vermag. Die Aufnahmen dieses „Kontrollversuchs“ sollen nun gleich vorgestellt werden.



Auf der Platte ohne Mitomycin C ist deutlich zu erkennen, daß in der Zone des Producerwachstums eine Aufhellung (=Lyse des Indikatorstammes) vorhanden ist.

In der producerfreien Randzone sind zahlreiche Plaques sichtbar, entstanden durch Verschleppen von vermehrungsfähigen Phagenpartikeln aus der Producerzone (siehe Material und Methoden 2.2.5.2.).



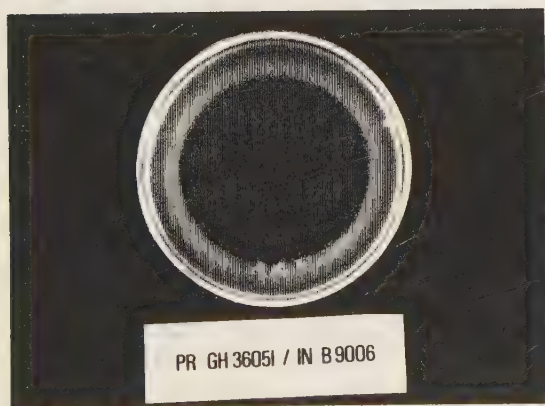
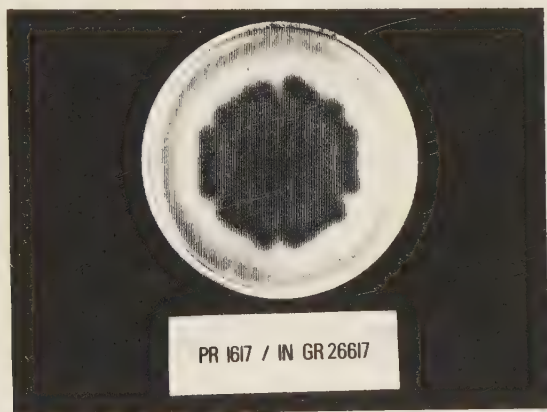
Auf dem Medium mit einer Mitomycinkonzentration von $0,25 \mu\text{g/ml}$ ist durch das Antibiotikum die Vermehrung des Phagen stimuliert worden.

Das äußert sich folgendermaßen:

1. In der Zone vorherigen Producerwachstums ist der Indikatorstamm nahezu völlig lysiert (am Rand ist die Plaquestruktur der Aufhellung noch zu erkennen).
2. In der producerfreien Randzone sind weit mehr und auch größere Plaques als auf der Platte ohne Mitomycin C.

Da der Indikatorrasen auf den Kontrollplatten (ohne und mit Mitomycin C, aber in beiden Fällen ohne Producerwachstum) geschlossen war, kann ausgeschlossen werden, daß die Lyse durch einen Phagen des Indikators selbst hervorgerufen wurde.

Zum besseren Verständnis der Ergebnisse von Tabelle 4 sollten zunächst zwei repräsentative Resultate vorgestellt werden:



In der Producerzone ist eine klare Aufhellung erkennbar (das gebildete, nicht vermehrungsfähige Bakteriozin reicht im ersten Fall bei der hohen Einsaatdichte nicht ganz aus, um alle Indikatorzellen vollständig am Wachstum zu hemmen, im zweiten schon).

Die producerfreie Randzone zeigt in beiden Bildern geschlossenes Wachstum (→ keine verschleppten Phagen).

Gewissermaßen als Nebenprodukt kann hier eine Aussage zur Größe der Bakteriozinmoleküle gemacht werden. Das erste Bild zeigt deutlich die Umrisse der Impfpunkte des Multipoint-Inoculators, mit dem der Producer aufgetragen wurde (→ kaum Diffusion, also hohes Molekulargewicht), während auf dem zweiten Bild eine runde, scharf begrenzte Aufhellungszone, größer als die Fläche des vorangegangenen Producerwachstums, den Schluß auf kleinere, leicht diffusible Bakteriozine nahelegt.

Bereits bei der Typisierung deutete das „Halbmond-Ergebnis“ (siehe 2.2.3.) bei der Konstellation Producer 36051 und Indikator 9006 auf eine hohe Diffusionsfähigkeit dieses Bakteriozins hin. Diese Vermutungen zur Größe der Bakteriozine konnten durch Greppmair (15) bestätigt werden.

Tabelle 4: Charakterisierung der Art der Wachstumshemmzonen

Producer		Indikator	Beurteilung der Producer- zone	Randzone
R5	o 0,25	20557	relativ klare Aufhellung (größer als Producerzone)	geschlossen "
R12	o 0,25	IFO 12552	fast keine Aufhellung (hohe Indikatordichte - Bakteriozin reicht nicht aus!)	" "
25384	o 0,25	109	fast keine Aufhellung "	" "
26965	o 0,25	26617	relativ klare Aufhellung "	" "

Fortsetzung Tabelle 4:

Producer	Indikator	Beurteilung der Producer- zone	Randzone
1617 o 0,25	26617	relativ klare Aufhellung	geschlossen
		"	"
o 0,25	IFO 13006	fast keine Aufhellung	"
		"	"
9636 o 0,25	20557	schwache Aufhellung	"
		"	"
11647 o 0,25	IFO 12552	schwache Aufhellung	"
		"	"
15732 o 0,25	25384	schwache Aufhellung	"
		"	"
4158 o 0,25	14159	fast keine Aufhellung	"
		"	"
25305 o 0,25	14159	fast keine Aufhellung	"
		"	"
25387 o 0,25	14159	fast keine Aufhellung	"
		"	"
30208 o 0,25	20557	relativ klare Aufhellung	"
		"	"
o 0,25	26617	relativ klare Aufhellung	"
		"	"
1799 o 0,25	3147	fast keine Aufhellung	"
		"	"
30893 o 0,25	R5	klare Aufhellung (größer als Producerzone)	"
		"	"
o 0,25	25411	schwache Aufhellung	"
		"	"
36051 o 0,25	9006	klare Aufhellung (größer als Producerzone)	"
		"	"
o 0,25	109	klare Aufhellung (größer als Producerzone)	"
		"	"
36618 o 0,25	26617	fast klare Aufhellung	"
		"	"

Fortsetzung Tabelle 4:

Producer	Indikator	Beurteilung der Producer- zone	Randzone
40655 o A o,25	9006	klare Aufhellung (größer als Producerzone)	geschlossen "
40655 o B o,25	9006	" "	" "
37042 o o,25	9006	" "	" "
1868 o o,25	9006	" "	" "
50616 o o,25	20557	fast keine Aufhellung "	" "
4703 o 27225 o,25	20557	fast klare Aufhellung "	" "
o o,25	15792	relativ klare Aufhellung "	" "
9505 o o,25	9006	klare Aufhellung (größer als Producerzone)	" "
o o,25	109	klare Aufhellung (größer als Producerzone)	" "
2846 o o,25	R5	klare Aufhellung, kleiner Ø " großer Ø (Mitoeffekt!)	" " "
o o,25	5382	klare Aufhellung, kleiner Ø " großer Ø (Mitoeffekt!)	" " "
o o,25	1617	fast klar im Zentrum, kl. Ø " gr. Ø (Mitoeffekt!)	" " "
D29 o o,25	J87	"Netz" aus Phagenplaques fast einheitl., klare Fläche Plaquestruktur am Rand noch erkennbar	zahlr. Plaques, Ø 1 µm mehr, größere Plaques (Mitoeffekt!)

Wie oben bereits angedeutet, hängen die verschiedenen Aufhellungsgrade in der Producerzone von der gebildeten Bakteriozinmenge ab (man beachte die hohe Indikatoreinsaat!). Alle verwendeten Indikatoren wurden sowohl ohne Mitomycin C und auf Medien mit 0,25 µg/ml auf eigene temperente Phagen untersucht (Methodik siehe oben). Ihre Anwesenheit konnte bei allen Indikatoren ausgeschlossen werden.

3.4. Verwandtschaftsbeziehungen der Acinetobacter-Bakteriozine - Charakterisierung der Hemmsubstanz

Um die „host-range“ der Acinetobacter-Bakteriozine zu bestimmen, wurden 12 Producer (mit möglichst verschiedenen Indikatormustern) auf Platten ohne Mitomycin C gegen 46 Stämme verschiedener Spezies getestet (vgl. 2.1.1.3.).

Die Producer waren:

2846, 30893, R5, 36051, 9505, 1617, 26965, 36618, 30208, 1868, R12, 37042

Die „Ausbeute“ war nicht groß, lediglich der Producer 2846 konnte die beiden verwendeten *Pseudomonas putida*-Stämme 917 und 936 sowie den *Achromobacter*-Stamm 1216 am Wachstum hemmen. Dieses Ergebnis spricht allerdings in Bezug auf die Frage nach dem hemmenden Agens eine bedeutende Rolle. Denn wie bereits in der Einleitung gesagt, gehört ein begrenztes Wirkspektrum auf Stämme der eigenen Art und weniger, nahe verwandter Arten zu den charakteristischen Eigenschaften eines Bakteriozins.

4. Diskussion

4.1. Reproduzierbarkeit der Typisierung

4.1.1. Abhängigkeit von Material und Methoden

Zunächst sollte auf experimentelle Aspekte eingegangen werden, die für die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse eine Rolle spielen. So war es bei mehreren Indikatoren (das sind die *Acinetobacter calcoaceticus* var. *Iwoffi*-Stämme R2, R3, R4, R4a, R4b sowie der *Acinetobacter calcoaceticus* var. *anitratus*-Stamm 9857) nicht leicht, sich auf $-/+$ oder $+/-$ beim Typisieren festzulegen. Sie bildeten nämlich etwas hellere, durchscheinende Kolonien, die auch bei dunklerem Untergrund keinen ausreichenden Kontrast zum Ablesen boten. Zudem zeigten die *Iwoffi*-Stämme ein deutlich langsames und schwächeres Wachstum. Ganz eindeutige + Ergebnisse waren bei diesen Stämmen nie vorhanden (ausgenommen artfremder Producer, siehe dort), bei 9857 teilweise schon. Die geringe Mitomycinresistenz dieser Stämme (siehe 3.1.) scheint hier keine Rolle zu spielen, da die Ergebnisse auch auf Medium ohne Mitomycin C nicht klarer waren. Da diese Indikatoren auch bei Wiederholungen meist nicht gut abzu- lesen waren, sollten sie nicht in einen evtl. auszuarbeitenden Indikatorsatz zur Identifizierung von Producerstämmen aufgenommen werden.

Ein ähnliches Problem bei der Auswertung bot der Stamm R12. Dieser bildete zwar gut sichtbare Kolonien, lieferte aber bei Wachstum in TSB keine gleichmäßig getrübbte Suspension, sondern bildete „Flocken“, die sich absetzten (Rauhstamm). Damit war es auch bei wiederholtem intensiven Aufschütteln nicht möglich, die angestrebte Dichte von 200 KB/Punkt zu erreichen. Auch dieser Stamm wäre als Indikator für ein epidemiologisches Typisieren nicht geeignet.

Bei den Producerstämmen können ähnliche Ableseprobleme auftauchen, und zwar dann, wenn die jeweilige Bakteriozinproduktion im Grenzbereich der Konzentration liegt, die zur deutlichen Wachstumshemmung nötig ist.

Dieser Gesichtspunkt spielt vielleicht bei den Kombinationen: Producer 30893/Indikator 4158, 25411 und 11647 eine entscheidende Rolle.

Hier hatte jeweils ein besonders deutlicher Unterschied der Hemmwirkung zwischen 0 und 0,25 µg/ml-Platten den Verdacht auf dieses Problem gelenkt. Die zuerst erhaltenen -/+ Ergebnisse bei einer Mitomycinkonzentration von 0,25 µg/ml wurden durch mehrere Wiederholungen zugunsten von + Ergebnissen korrigiert (0-Platten unverändert -/+).

Zur Bestätigung dieses Sachverhaltes mag auch das erzielte, eindeutig positive Resultat bei 0,5 µg/ml im Fall des Indikators 11647 dienen.

4.1.2. Reproduzierbarkeit der Ergebnisse

Um exakte Aussagen darüber zu bekommen, ob Bakteriozinproduktion und -sensibilität stabile Marker sind - unabhängig von den o.g. Schwierigkeiten bei der Versuchsauswertung - wäre es notwendig, die gesamte Typisierung in größeren Zeitabständen mehrmals zu wiederholen. Dies konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht durchgeführt werden. Es sollen aber im folgenden einige Überlegungen aufgezeigt werden, die insgesamt gesehen den Schluß auf die Stabilität der Merkmale zulassen:

Alle 4900 Kombinationen wurden sowohl ohne als auch mit Mitomycinstimulation durchgetestet. Dies läßt sich bereits - zumindest bei spontanen Producern - als Kontrolle ansehen. Ansonsten wurden Wiederholungen, abgesehen von den schlecht abzulesenden Indikatoren und Producern, nur bei den im Rahmen des Screenings entdeckten Stämmen ATCC 27225, 9505 und 2846 gemacht. Sie wurden nochmals bei 0 und 0,25 µg/ml Mitomycin C gegen alle 70 Indikatoren getestet, wobei sich die Typisierungsergebnisse bestätigen ließen.

Auch Stämme, die nach Bakteriozinotypie und Antibiotogramm als identisch betrachtet werden können, sprechen deutlich für die Reproduzierbarkeit der Marker.

Weiterhin sprechen dafür (allerdings wurden hier nur positive Ergebnisse wiederholt) die Versuche zum Ausschluß von Bakteriophagen, da vorher in der Typisierung herausgefundene Producer-Indikatorpaare benutzt wurden.

Zuletzt sollte noch die schon erwähnte Arbeit zur Analyse der *Acinetobacter* bakteriozine aufgeführt werden, in der ebenfalls die in dieser Untersuchung gewonnenen Typisierungsergebnisse verwendet wurden und sich als reproduzierbar erwiesen (15).

4.2. Anwendbarkeit der Erkenntnisse für epidemiologische Zwecke

Über eine unabdingbare Voraussetzung, die Stabilität der Marker, wurde im vorherigen Abschnitt gesprochen. Der zweite wesentliche Faktor, um eine möglichst hohe Zahl von Stämmen zu typisieren, ist die Häufigkeit der Merkmale Bakteriozinproduktion und -sensibilität.

Prinzipielle Möglichkeiten sind also Typisierung nach

1. Bakteriozinproduktion
2. Bakteriozinsensibilität

Die erstgenannte Verfahrensweise mit Hilfe eines Indikatorsatzes kann nur sinnvoll angewendet werden, wenn ein hoher Prozentsatz der zu untersuchenden Stämme sich als Producer erweist, wie es zum Beispiel bei *Pseudomonas aeruginosa* der Fall ist. Bei dieser Spezies zeigen nahezu 100% aller Stämme spontane Producereigenschaften, was zu hoher Typisierbarkeit führt (3). Im Gegensatz dazu konnte bei *Acinetobacter calcoaceticus* lediglich eine Produzerrate von 32% gefunden werden.

Dieser Wert liegt zwar deutlich über dem von Hellinger (17) gefundenen bei *Providencia rettgeri* (21%), er scheint aber für eine Typisierung nicht ausreichend.

Eine Typisierung nach Indikatoreigenschaften (durch einen festen Producersatz) bietet sich hier eher an. Denn (unter Berücksichtigung der Stämme 9505 und 2846) es lassen sich bei 0,25 µg/ml Mitomycin C 65% der Stämme als Indikatoren erkennen.

Eine Typisierung nach beiden Merkmalen - Producer und Indikatoren - liefert zwar einen größeren typisierbaren Anteil (72%), wäre aber für epidemiologische Zwecke auch aufwendiger.

Inwieweit die Verwendung höherer Mitomycinkonzentrationen zu einem höheren Prozentsatz typisierbarer Stämme führen würde, ohne zu Lasten der Spezifität (breiteres Spektrum) zu gehen, müßte eigens überprüft werden.

Stellt man nun abschließend die Frage nach einer epidemiologischen Nutzung der Erkenntnisse, so ist vorsichtiger Optimismus durchaus am Platz. Zum einen liegen nämlich die Zahlen bei diesem ersten Typisierungsversuch vergleichsweise recht hoch, zum anderen sollte auch die Suche nach neuen, breiten Producern und Indikatoren erfolgversprechend sein (unser bester Producer 2846 erreichte uns mit den zuletzt erhaltenen Stämmen!).

Als erster Anhalt für epidemiologische Anwendbarkeit kann bereits das Identifizieren der erwähnten identischen Stämme gelten.

Zusammenfassung =====

In der Gattung *Acinetobacter* treten Stämme auf, die spontan oder durch Mitomycin C induziert, Substanzen produzieren, die andere Stämme am Wachstum mindern.

Stämme, die gegen ihr eigenes Bakteriozin empfindlich sind, wurden nicht gefunden. 70 Stämme wurden zunächst ohne und bei einer Mitomycinkonzentration von 0,25 µg/ml als potentielle Producer und Indikatoren getestet (insgesamt 4900 Kombinationen).

Unter den 70 Stämmen fand sich ein Produceranteil von 32%. Als Indikatoren erwiesen sich 47% der Stämme.

Mit Hilfe weiterer im Rahmen eines zusätzlichen Screenings entdeckter Producer ließ sich der Indikatoranteil auf 65% erhöhen. Bakteriophagen konnten als Ursache der Wachstums- hemmung ausgeschlossen werden.

Charakteristisch für die Bakteriozine war ein enges Wirkspektrum. Bakteriozinproduktion und -sensibilität erwiesen sich als stabile Marker.

Mit diesen Ergebnissen wurde ein Weg für die Aufklärung der Epidemiologie von Infektionen mit *Acinetobacter calcoaceticus* durch Bakteriozinotypie eröffnet.

LITERATURVERZEICHNIS

1. Bauernfeind, A.: Vergleich der antibakteriellen Aktivität von zehn Cephalosporinen, Fortschritte der antimikrobiellen und antineoplastischen Chemotherapie Bd. 2-2, 1983, 203-218
2. Bauernfeind, A., Burrows, J.R.: Suggested Procedure Allowing Use of Plastic Petri Dishes in Bacteriocin Typing, Applied and Environmental Microbiology, May 1978, 970
3. Bauernfeind, A., Petermüller, C., Schneider, S.: Bacteriocins as Tools in Analysis of Nosocomical *Klebsiella pneumoniae* Infections, Journal of Clinical Microbiology, July 1981, 15-19
4. Beijerinck, M.W.: Pigmenten als oxydatieproducten door bacterien gevormd. Versl. Koninklijke. Akad. Wetensch. Amsterdam 19, 1911, 1092
5. Bergan, T., Vaksvik, A.K.: Taxonomic Implications of Quantitative Transformation in *Acinetobacter calcoaceticus* Zbl. Bakt. Hyg. 1. Abt. Orig. A 254, 1983, 214-228
6. Bergogne-Berezin, E., Joly-Guillou, M.L., Megrand, F., Verin, C.; In Vitro Activity of N-Formimidoyl-Thienamycin Compared with Beta-Lactamase-Stable Compounds Against Clinical Strains of *Acinetobacter calcoaceticus*, Current Chemotherapy & Immunotherapy, Proc. 12th Internat'l. Congr. of Chemotherapy, Florence, Italy 19-24 July, 1981, 721-723
7. Bergogne-Berezin, E., Joly, M.L., Moreau, N., Le Goffic, F.: Aminoglycoside-Modifying Enzymes in Clinical Isolates of *Acinetobacter calcoaceticus*, Current Microbiology, Vol. 4, 1980, 361-364

8. Bradley, D.E.: Ultrastructure of bacteriophages and bacteriocins, *Bact. Rev.* 31, 1967, 230-314
9. Brandis, A., Smarda, J.: Bacteriocine und bacteriocinähnliche Substanzen, Fischer, Jena, 1971
10. Dibb, W.L., Kjellevoid, V., Digranes, A.: *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter calcoaceticus*: In vitro Susceptibility of 150 Clinical Isolates to Five β -Lactam Antibiotics and Tobramycin, *Chemotherapy* 29, 1983, 332-336
11. Foulds, J.: Mode of action of a bacteriocin from *Serratia marcescens*, *J. Bacteriol.* 107, 1971, 833-839
12. French, G.L., Casewell, M.W., Roncroni, A.J., Knight, S., Phillips, J.: A hospital outbreak of antibiotic-resistant *Acinetobacter anitratus*: epidemiology and control, *Journal of Hospital Infection*, 1980, 1, 125-131
13. Ghoneim, A.T.M., Halaka, A.: Meningitis due to *Acinetobacter calcoaceticus* variant *anitratus*, *Journal of Hospital Infection*, 1980, 1, 359-361
14. Gilardi, G.L.: Antimicrobial Susceptibility as a Diagnostic Aid in the Identification of Nonfermenting Gram-Negative Bacteria, *Applied Microbiology*, Nov. 1971, 821-823
15. Grepnmaier, C.: Die Natur der Bakteriozine von *Acinetobacter calcoaceticus* var. *anitratus*, Inauguraldissertation in Bearbeitung, München 1983
16. Hardy, K.G.: Colicinogeny and related phenomena *Bact. Rev.* 39, 1976, 464-515

17. Hellinger, B.: Ein neuer Weg zur Typisierung von *Proteus rettgeri*, Inauguraldissertation, München 1977
18. Hinchliffe, E., Vivian, A.: Naturally Occuring Plasmids in *Acinetobacter calcoaceticus*: a P Class R Factor of Restricted Host Range, *Journal of General Microbiology* 1980, 116, 75-80
19. Hinchliffe, E., Vivian, A., Fewson, C.A.: *Acinetobacter calcoaceticus*: some approaches to a problem, *Journal of Hospital Infection*, 1981, 2, 199-203
20. Holton, J.: A report of a further hospital outbreak caused by a multi-resistant *Acinetobacter anitratus*, *Journal of Hospital Infection*, 1983, 3, 305-309
21. Müller, H.E.: *Acinetobacter calcoaceticus* als Erreger nosokomialer Infektionen, *Hygiene + Medizin* 6, 1981, 193-197
22. Murray, B.E., Moellering, R.C. JR.: Evidence of Plasmid Mediated Production of Aminoglycoside-Modifying Enzymes Not Previously Described in *Acinetobacter*, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, Jan. 1980, 30-36
23. Raz, R., Alroy, G., Sobel, J.D.: Nosocomial Bacteremia due to *Acinetobacter calcoaceticus*, *Infection* 10. 1982, Nr. 3, 168-171
24. Rosenthal, S.L.: Clinical Role of *Acinetobacter* and *Moraxella*, *Glucose Nonfermenting Gram-Negative Bacteria in Clinical Microbiology* by Gerald L. Gilardi, CRC Press Inc., West Palm Beach, Florida, 1978, 105-115

19. Ruben, S.J., Granato, P.A., Wasilauskas, B.L.: Glucose-nonfermenting Gram-negative bacteria, *Manual of Clinical Microbiology*, 3rd edn., American Society for Microbiology, Washington, 1980, 263-287
20. Schütz, J.: Bakteriozine in der Gattung *Providencia*, Inauguraldissertation, München 1981

Lebenslauf

Ich wurde am 07.07.1959 in München als Sohn des Zimmermanns Matthäus Rattenberger und seiner Ehefrau Theresia Rattenberger, geb. Spagert, beide wohnhaft in Neufahrn b. Freising, geboren.

Ab 1965 besuchte ich die Volksschule Neufahrn, wechselte 1969 an das Josef-Hofmiller-Gymnasium in Freising, wo ich 1978 das Abitur ablegte.

Im Mai 1979 begann ich das Studium der Humanmedizin an der Ludwig Maximilians-Universität in München, das ich am 25.04.1985 mit der ärztlichen Prüfung abschloß.

